

論文の内容の要旨

論文題目 好気性芽胞形成細菌の分類と同定に関する研究

氏名 後藤 慶一

筆者らは精度が高く、迅速に結果が得られ、かつ幅広い好気性芽胞形成細菌に対応可能な同定法の開発を、近年急速な進歩を遂げている分子系統分類学的手法(16S rRNA 遺伝子の塩基配列の解析)に着目して実施した。

まず、最も多くの種を抱える *Bacillus* 属細菌について、1998 年当時 IJSB(現 IJSEM)に承認されていた 69 種中、*B. anthracis*を除く 68 種の基準株の 16S rDNA 塩基配列を決定し、多重配列解析を行った。その結果、16S rDNA 塩基配列は非常に種特異的で、この配列の比較によって *Bacillus* 属細菌を種レベルで同定あるいはグループ化することが可能であることが示された。さらに、多重配列比較の結果から、16S rDNA の 5' 末端側に約 300 塩基ほどの非常に変異に富んだ領域(Hyper Variable 領域:HV 領域)が見いだされた。そこで筆者らは、より簡易化を図ることを念頭に、この

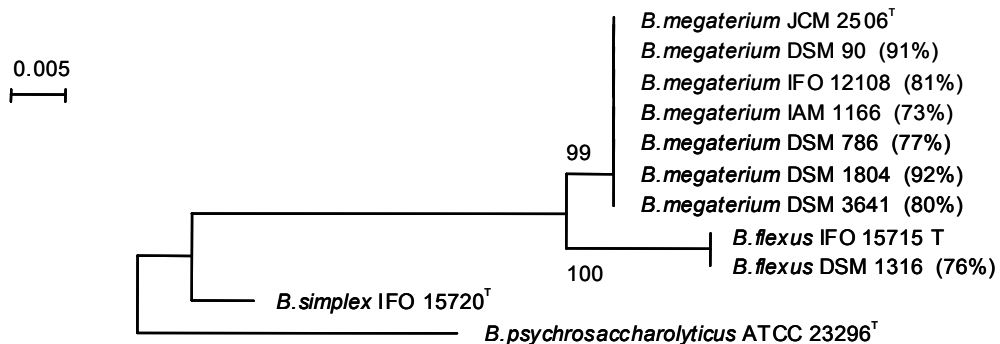


図1 *Bacillus megaterium* クラスターにおける HV 領域の保存性

デンドログラムは NJ 法により構築した。アウトグループとして、*Bacillus psychrosaccharolyticus* を用いた。枝上のローマ数字はブーツストラップ値を示す。括弧内の数値は基準株との DNA-DNA 相同値(%)を示す。

HV 領域が同定の指標となりうるか否かを、基準株以外の菌株および HV 領域を解析するためのプライマーセットを用いて検証を行った（後に、設計したプライマーは全ての細菌に共通して使用できることが分かった）。その結果、HV 領域の塩基配列は種内で非常に良く保存され（図1）、かつ種間で異なっており、従って HV 領域の塩基配列の相同性解析により、16S rDNA よりも簡便に *Bacillus* 属細菌を同定あるいはグループ化することが可能であることが示された。

次に、清涼飲料業界で非常に問題視されている *Alicyclobacillus* 属細菌に関して、6 種および 1 遺伝種（2002 年までに登録されている全種）の総計 24 菌株について 16S rDNA および HV 領域の解析を行ったところ、*Bacillus* 属細菌と同様に、HV 領域は *Alicyclobacillus* 属細菌を種レベルで同定、あるいはグループ化するための指標として非常に優れていることが示された。同時に、清涼飲料原料および製品から分離された新規 *Alicyclobacillus* 属細菌に関して、多相分類学的な試験を施し、それぞれ *A. acidiphilus*、*A. herbarius* および *A. pomorum* を提案するとともに、*Alicyclobacillus* 属の記載に修正を加えた（図2）。また、日本の様々な環境から分離された 60 菌株の高温性・好酸性芽胞形成細菌に HV 領域の解析法を応用したところ、58 菌株については *A. acidocaldarius* あるいは *Alicyclobacillus* genomic species 1 と同定され、そしていずれにも当てはまらない 2 菌株については、新規遺伝種 *Alicyclobacillus* genomic species 2 として提案した。さらに、業界で問題視されている異臭（グアイアコール）産生菌種について検討を加え、*A. acidiphilus*、*A. acidoterrestris*、*A. herbarius* および *A. hesperidum* に近縁な *Alicyclobacillus* sp. がグアイアコールの産生菌種であることを明らかにした（表1）。

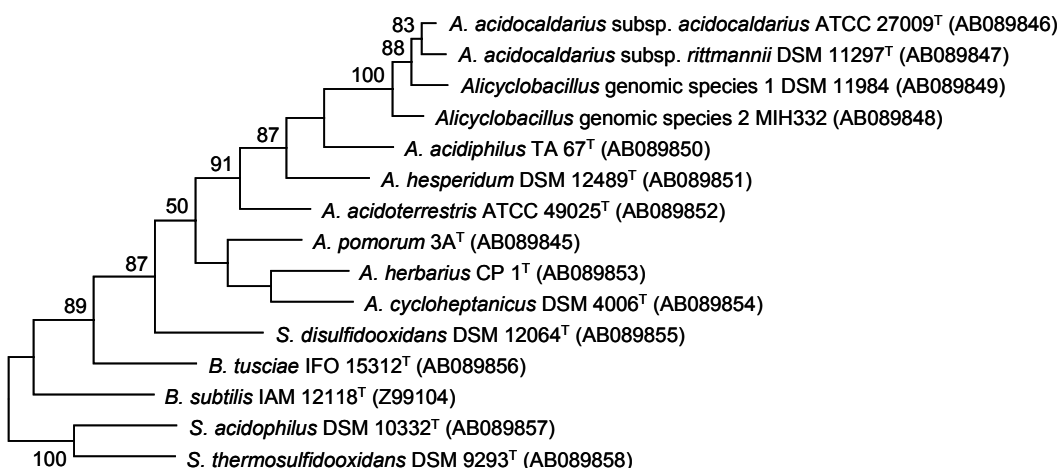


図2 *Alicyclobacillus* 属細菌由来 *gyrB* 遺伝子塩基配列に基づく系統樹
 系統樹は 1,164 塩基の比較に基づき、MP 法により構築した。アウトグループとして *Sulfobacillus* 属を用いた。枝上のローマ数字はブーツストラップ値を示す。

表1 *Alicyclobacillus* 細菌基準株のグアイアコール産

Species	Strain	Guaiacol (ppb)
<i>Alicyclobacillus</i> genomic species 1	DSM 11984	0
<i>Alicyclobacillus</i> genomic species 2	MIH 332	0
<i>A. acidocaldarius</i> subsp. <i>acidocaldarius</i>	ATCC 27009 ^T	0
<i>A. acidocaldarius</i> subsp. <i>rittmannii</i>	DSM 11297 ^T	0
<i>A. acidoterrestris</i>	ATCC 49025 ^T	218
<i>A. acidiphilus</i>	TA 67 ^T	480
<i>A. hesperidum</i>	DSM 12489 ^T	0
<i>A. cycloheptanicus</i>	DSM 4006 ^T	0
<i>A. herbarius</i>	CP 1 ^T	490

Paenibacillus 属細菌 28 種 56 菌株を用いた HV 領域の解析では、HV 領域は種レベルで高度に保存されていることが確かめられたが、一方で *P. polymyxa* には生理・生化学的性状では区別ができない二つの遺伝子グループが存在し、これらと *P. peoriae* には密接な関係があることも明らかになった。このような種内多様性および近縁種同士の密接な関係は *P. thiaminolyticus* グループに於いても見られ、分類学的な再検討が必要であることが指摘された。

そして、*Brevibacillus* 属細菌に関し、29 菌株の *B. brevis* について HV 領域の解析を実施したところ、そのほとんどは *B. brevis* 以外の種と高い相同性を示した。分類学的な試験の結果、これらは誤同定であることが明らかとなり、*Aneurinibacillus* 属および *Brevibacillus* 属の適切な種へ再同定した。併せて、*B. brevis* として同定されていた菌株中に、いずれの既知種にも当てはまらない 2 菌株が見いだされ、これらを分類学的な試験結果に基づき、それぞれ *Aneurinibacillus danicus* および *Brevibacillus limnophilus* と命名した。総計 50 菌株についての HV 領域の解析結果は、HV 領域が種レベルで高度に保存されており、同定あるいはグループ化に有効であることを示した。一方で、*B. brevis*、*B. formosus* および *B. choshinensis* が互いに非常に近縁で(表 2)、関連菌株を含めた再分類が必要であることも示唆された。

表2 *Brevibacillus brevis*、*Brevibacillus formosus* および *Brevibacillus choshinensis* クラスターにおける 16S rDNA の変異部位

Strain	Nucleotide position													
	72	73	74	81	82	83	187	200	388	612	620	1055	1057	1266
<i>Brevibacillus brevis</i> DSM 30 ^T (AB101593)	K	S	T	A	S	S	C	R	T	G	C	C	T	A
<i>Brevibacillus brevis</i> DSM 5619 (AB112730)	K	S	T	A	S	S	Y	G	T	G	C	C	T	A
<i>Brevibacillus brevis</i> DSM 5760 (AB112731)	G	G	T	A	C	C	C	G	T	A	T	C	T	R
<i>Brevibacillus formosus</i> DSM 9885 ^T (AB112712)	T	C	T	A	G	G	Y	G	T	G	C	C	T	A
<i>Brevibacillus choshinensis</i> DSM 8552 ^T (AB112713)	T	C	Y	R	G	G	C	G	C	A	T	T	C	G

数字は *Bacillus subtilis*(*rrE*) のナンバリングに基づく。K:G または T、R:A または G、S:C または G、Y:C または T を示す。

以上の結果をふまえ、その他の好気性芽胞形成細菌 11 属 52 種 (*Amphibacillus* 属 3 種、*Anoxybacillus* 属 2 種、*Geobacillus* 属 10 種、*Gracilibacillus* 属 2 種、*Halobacillus* 属 4 種、*Sporolactobacillus* 属 5 種、*Sporosarcina* 属 5 種、*Sulfobacillus* 属 3 種、*Thermoactinomyces* 属 6 種、*Ureibacillus* 属 2 種および *Virgibacillus* 属 7 種) について 16S rDNA および HV 領域の解析を行った。その結果、分類学的な検討の余地が残されている分類群がいくつか見られたが、基本的に HV 領域はそれぞれの基準株に特異的で、近縁種の基準株との区別が可能であった。調べた基準株の中には、近縁種との区別が形態や生理・生化学的性状では判別できない群も存在したが、このようなグループでも HV 領域には基準株間で違いが見られ、容易に判別することが可能であった。

以上のことから、好気性芽胞形成細菌全体を通じて、生理・生化学的性状では区別ができない菌種も、HV 領域の塩基配列を比較することにより、容易に好気性芽胞形成細菌を同定、あるいはグループ化することが可能であることが示された。

また、HV 領域が多様性に富んでいる理由について、*Thermus thermophilus* の 16S rRNA の二次構造を基に考察をしたところ、HV 領域は、①他の領域ほどリボゾームタンパク質との結合部位が含まれていないこと、②大サブユニットと接していないこと、また③翻訳領域から離れていることから、変異が起こっても機能的に影響が少ない部位が HV 領域中には多く存在し、そのため変異が集積したものと推察された。

最後に、一連の研究を通じて決定した 16S rDNA 塩基配列を用いた好気性芽胞形成細菌 204 種の系統解析では、9 割を超える菌種が属あるいは表現形に基づく分類群ごとにクラスターを形成することが示され、また、これらのクラスターは過去に報告された 16S rRNA に基づく好気性芽胞形成細菌 51 種のグルーピングともよく一致していた。しかしながら、①2003 年 7 月までに好気性芽胞形成細菌は 22 属 208 種にまで膨れあがったこと、②新属・新種提案の際に、本来近縁である、あるいは同属であろう菌種を含めて検討がされていない場合があること、③質の低い 16S rDNA のデータが系統解析に用いられてきていること、④属の規定が実質上困難になりつつあること、⑤さらには全体像を見据えた分類が行なわれてきていなかったことから、一部のクラスターに於いては不均質を招いてしまっていることが示唆された。こういった状況は好気性芽胞形成細菌に限ったことではなく、細菌全体に当てはまることであろう。この後、分類基準の見直し、あるいは新たな指標の出現が期待されるところであるが、一連の研究成果を基に、好気性芽胞形成細菌だけではなく、細菌全体の分類学に貢献し、かつ食品産業の発展に寄与するようさらに研究を進めていきたい。